

Quantitative determin. of substrates or enzymatic activities - involves
treating with oxidative enzymes and measuring amt. of hydrogen peroxide
produced

Patent Assignee: TOYOB0 KK (TOYM)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 59011197	A	19840120	JP 83113870	A	19820709	198409 B

Priority Applications (No Type Date): JP 83113870 A 19820709; JP 8259285 A
19820408

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 59011197	A	6		

Abstract (Basic): JP 59011197 A

Quantitative determin. comprises causing to act oxidative enzymes to substrates or substances produced by enzymatic reactions and measuring the amt. of hydrogen peroxide produced. First reagent contg. an oxidative enzyme, peroxidase and a phenol deriv. of formula (I) is added to the sample, and second reagent contg. a coupler is added to the sample soln..

In (I), R1 is halogen; R2 is 1-5C alkyl, 1-5C acyl, 1-5C alkyl ether, 1-5C alkoxy carbonyl or one of these gps. having a hydroxyl gp. or a sulphonic acid gp.; n= 1-4.

Method is useful for quantitatively determining substrates (e.g. cholesterol esters, etc.) in the body fluid or enzymatic activities (e.g., GPT, GOT, etc.)

0/0

Title Terms: QUANTITATIVE; DETERMINE; SUBSTRATE; ENZYME; ACTIVE; TREAT; OXIDATION; ENZYME; MEASURE; AMOUNT; HYDROGEN; PEROXIDE; PRODUCE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C12Q-001/28; G01N-033/50

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B01-D02; B04-B02C2; B10-A09B; B10-E02; B11-C07;
B12-K04; D05-A02

Chemical Fragment Codes (M1):

02 M423 M430 M782 M903 N102 N134 P831 Q505 V802 V811
03 M423 M760 M903 N102 P831 V600 V614 V615 V616 V632 V634 V644
04 M423 M750 M903 N102 N134 P831 V802 V812 V815 V816

Chemical Fragment Codes (M2):

01 G015 G017 G018 G100 H4 H401 H402 H403 H404 H405 H441 H481 H482 H483
H484 H541 H542 H543 H6 H600 H641 H8 J011 J012 J013 J014 J231 J232
J581 J582 J583 K431 K499 L650 L660 L699 M210 M211 M212 M213 M214
M215 M231 M232 M233 M240 M262 M272 M280 M281 M282 M283 M311 M312
M313 M314 M315 M320 M321 M322 M323 M331 M332 M333 M340 M342 M349
M373 M381 M383 M391 M392 M393 M414 M430 M510 M520 M531 M540 M782
M903 N102 N134 P831 Q505

Chemical Fragment Codes (M5):

05 M750 M903 N102 N134 P831 S005 S032 S131 S133 S134 S142 S143 S303
S317 S703 S730 S735 S736 U560 U563

Chemical Fragment Codes (M6):

06 M903 P831 Q505 R515 R521 R624 R627 R632 R638

3/9/2 (Item 1 from file: 345)

DIALOG(R)File 345:Inpadoc/Fam.& Legal Stat

(c) 2001 EPO. All rts. reserv.

4919407

Basic Patent (No,Kind,Date): JP 59011197 A2 840120 <No. of Patents: 001>

PATENT FAMILY:

JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 59011197 A2 840120

DETERMINATION OF SUBSTRATE OR ENZYMATC ACTIVITY (English)

Patent Assignee: TOYO BOSEKI

Author (Inventor): TEJIMA SHINICHI; MITSUHIDA NOBORU; NAKAGIRI

YOSHITAKA
Priority (No,Kind,Date): JP 83113870 A 830623
Applc (No,Kind,Date): 83113870 A 830623
IPC: * C12Q-001/28; G01N-033/50
CA Abstract No: * 101(01)003552W
Derwent WPI Acc No: * C 84-052604
JAPIO Reference No: * 080093C000134
Language of Document: Japanese

3/9/3 (Item 1 from file: 347)

DIALOG(R) File 347:JAPIO
(c) 2001 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

01299597 **Image available**
DETERMINATION OF SUBSTRATE OR ENZYMATIC ACTIVITY

PUB. NO.: 59-011197 A}
PUBLISHED: January 20, 1984 (19840120)
INVENTOR(s): TEJIMA SHINICHI
 MITSUHIDA NOBORU
 NAKAGIRI YOSHITAKA
APPLICANT(s): TOYOB CO LTD [000316] (A Japanese Company or Corporation),
 JP (Japan)
APPL. NO.: 58-113870 [JP 83113870]
FILED: June 23, 1983 (19830623)
INTL CLASS: [3] C12Q-001/28; G01N-033/50
JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 28.2
 (SANITATION -- Medical); 46.2 (INSTRUMENTATION -- Testing)
JOURNAL: Section: C, Section No. 220, Vol. 08, No. 93, Pg. 134, April
 27, 1984 (19840427)

ABSTRACT

PURPOSE: To measure a true substrate or enzymatic activity simply, by reducing the admixture of materials occurring in a specimen causing a measuring error.

CONSTITUTION: In the determination of substrate or enzymatic activity in a specimen by treating a substance formed by a substrate or enzymatic reaction with oxidase, measuring formed hydrogen peroxide, the specimen is reacted with the first reagent containing the oxidase, peroxidase, and a phenol derivative shown by the formula (R₁ is halogen; R₂ is lower alkyl, lower acyl, lower alkoxy, lower alkoxy carbonyl, etc.; n is 1-4) to form hydrogen peroxide, which is reacted with the phenol derivative in the presence of peroxidase, reacted with the second reagent containing a coupler such as 4-aminoantipyrine, colored, and it is determined by colorimetry.

?s an,pn=jp 5847499
 0 AN=JP 5847499
 0 PN=JP 5847499
 S4 0 AN,PN=JP 5847499
?s an,pn=jp 58047499
 0 AN=JP 58047499
 3 PN=JP 58047499
 S5 3 AN,PN=JP 58047499
?t s5/9/all

5/9/1 (Item 1 from file: 351)

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

003680664
WPI Acc No: 1983-40636K/*198317*
XRAM Acc No: C83-039696
XRPX Acc No: N83-073324

Determin. of body fluids components - by colorimetric determin. of hydrogen peroxide obtd. by redox due to oxidative condensn.

Patent Assignee: IATRON LABORATORIES (IATR)

⑨ 日本国特許庁 (JP)
 ⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
 昭59-11197

⑤Int. Cl.³
 C 12 Q 1/28
 G 01 N 33/50

識別記号
 庁内整理番号
 8213-4B
 Z 8305-2G

⑬公開 昭和59年(1984)1月20日
 発明の数 1
 審査請求 未請求

(全 6 頁)

④基質または酵素活性の定量方法

②特 願 昭58-113870
 ②出 願 昭57(1982)4月8日
 ③特 願 昭57-59285の分割
 ⑦発明者 手嶋真一
 敦賀市呉羽町8番2の308号

⑦発明者 光飛田登

敦賀市東洋町1番6号

⑦発明者 中桐義隆

敦賀市東洋町9番4号

⑦出願人 東洋紡績株式会社

大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

明細書

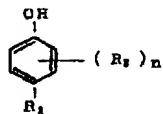
1. 発明の名称

基質または酵素活性の定量方法

2. 特許請求の範囲

基質又は酵素反応により生成した物質に酸化酵素を作用させ、生成する過酸化水素を測定することにより、試料中の基質または酵素活性を定量する方法において、(I)酸化酵素と(II)ペルオキシダーゼと⑨下記一般式(I)で表わされるフェノール誘導体を含む試液を第1試液とし、(M)カツブラーを含む試液を第2試液とし、試料に第1試液を加えた後、第2試液を加えることを特徴とする基質又は酵素活性の定量方法。

一般式(I)：



(式中、R1はハロゲンを示す。R2は水素以外の基質または⑩炭素原子数が1～5である低級アル

キル基、⑨炭素原子数が1～5である低級アシル基、⑩炭素原子数が1～5である低級アルキルエーテル基、⑪炭素原子数が1～5である低級アルコキシカルボニル基あるいは⑫水酸基またはスルホン酸基を有する上記①～⑩の基を示す。n=1～4である。)

3. 発明の詳細な説明

本発明は体液中の基質または酵素活性の定量方法に関するものである。

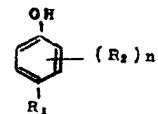
近年、臨床検査において体液中の基質量または酵素活性を定量する方法として、基質または酵素反応により生成した物質に酸化酵素を作用させ、生成する過酸化水素を測定する方法が盛んに用いられている。

これらの過酸化水素の測定方法として、ペルオキシダーゼの酵素作用により、(1)4-アミノアンチビリン、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドライジン等のカツブラーと(2)フェノール誘導体、アニリン誘導体またはナフトール誘導体等の色原体とを酸化結合させて発色体とし、その光学的吸

See a few abstracts

(1) 酸化酵素と(2)ペルオキシダーゼと(3)下記一般式(1)で表わされるフェノール誘導体を含む試液を第1試液とし、(4)カップラーを含む試液を第2試液とし、試料に第1試液を加えた後、第2試液を加えることを特徴とする基質又は酵素活性の定量方法である。

一般式(1)：



(式中、R₁はハロゲンを示す。R₂は①炭素原子数が1～5である低級アルキル基、②炭素原子数が1～5である低級アシル基、③炭素原子数が1～5である低級アルキルエーテル基、④炭素原子数が1～5である低級アルコキシカルボニル基あるいは⑤水酸基またはスルホン酸基を有する上記の～④の基を示す。n=1～4である。)

本発明では、上記第1試液を加えた後、第2試液を加えることにより、体液中の遊離コレステロール

一ル、遊離グリセロール、ブドウ糖、ビルピン酸等の計り込みを防止し、簡便且つ正確に目的とする基質又は酵素活性を測定することが可能となつた。体液中の遊離コレステロール、遊離グリセロール、ブドウ糖、ビルピン酸等はフェノール誘導体、アニリン誘導体またはナフトール誘導体と反応(自己結合反応)して可視部に吸収を示さない化学物質に変換され、目的とする基質又は酵素活性を測定する反応系に関与しないものと考えられる。逆に第2試液を加えてから第1試液を加えると、目的が達成されない。またL-アミノアンチビリンを酸化酵素、ペルオキシダーゼとともに含む試液を第1試液とし、フェノール誘導体を含む試液を第2試液とし、第1試液を加えてから第2試液を加えても目的は達成されない。例えばトリグリセライド測定において、グリセロキナーゼとグリセロリン酸オキシダーゼを用いて生成した過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下、L-アミノアンチビリンと反応(自己結合反応)させた後、リバーゼとフェノール誘導体を加え発色体を生成

して、真的トリグリセライドのみを比色測定しようと試みた。しかし、この方法では第1反応であるL-アミノアンチビリンと遊離グリセロールとの反応(自己結合反応)で可視部に吸収を有する物質(測定波長に影響を与える物質)が生成し、第2反応で生成した発色体の比色測定に正誤差となり、問題が生じた。

また、真的トリグリセライドを測定する方法として、遊離グリセロール値を計り込んだ総トリグリセライド値と遊離グリセロール値を各々測定し、その差を求める方法があるが、簡易性の点で問題があつた。本発明は上記方法より簡易性の点で優れる。

本発明方法は基質又は酵素反応により生成した物質に酸化酵素を作用させ、生成する過酸化水素を測定することにより、試料中の基質又は酵素活性を定量する方法である。

定量する基質としては、体液中のコレステロールエステル、トリグリセライド、クレアチニン、クレアチシンなどがある。

定量する酵素としては、体液中のアミノトランスアミナーゼ、例えばグルタミン酸オキダロ醇酸トランスアミナーゼ (GOT) 、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) 、アミラーゼなどがある。

酵素反応により生成した物質としては、コレステロールエステルにコレステロールエステラーゼを作用させて生成したコレステロール、トリグリセライドにリバーゼを作用させて生成したグリセロール、グリセロールにグリセロキナーゼを作用させて生成したグリセロール-3-リン酸、ヨーケトグルタル酸とアラニンにグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) を作用させて生成したピルビン酸、デンプンまたはア-サイクロデキストリンを基質として、アミラーゼ、グルコアミラーゼを作用させ生成したブドウ糖などがある。

上記基質又は上記酵素反応により生成した物質に作用させる酸化酵素としては、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリ

本発明に用いるカッブラーとしては、4-アミノアンチビリン、3-メチル-2-ベンゾチアゾリンヒドロゾン等がある。

本発明に用いる試薬は(I)酸化酵素と(II)カルオキシ試液及び(IV)カルボ-2含有試液をシダーゼと側エノール誘導体を含む試液を第2試液とする。第2試液にはアニリン誘導体が含まれていてもよい。

アニリン誘導体としては、アニリン、N,N-ジメチルアニリン、N,N-ジエチルアニリン、N,N-ジエチル-2-トルイジン、N,N-ジメチル-2-アニシジン、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシエチル)-2-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロビル-2-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロビル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロビル)-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロビル-2-

セロリン酸オキシダーゼ、ピルビン酸オキシダーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどがある。

本発明に用いる一般式(I)で表わされるフェノール誘導体としては、たとえば3-メチル-4-クロロフェノール、3-メチル-4-プロモフェノール、3-エチル-4-クロロフェノール、3-アセチル-4-クロロフェノール、3-エチルカルボニル-4-クロロフェノール、3-メトキシカルボニル-4-クロロフェノール、3-エトキシカルボニルクロロフェノール、3-ヒドロキシメチル-4-クロロフェノール、3-ヒドロキシエチル-4-クロロフェノール、3-ヒドロキシプロピル-4-クロロフェノール、3-スルホプロピル-4-クロロフェノール、3-ヒドロキシアセチル-4-クロロフェノール、3-スルホプロピルカルボニル-4-クロロフェノール、3-ヒドロキシアセトキシカルボニル-4-クロロフェノールなどがある。

アニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロビル)-2-アニシジン等がある。

第1試液および第2試液には前記成分に加えて、緩衝剤、および必要により界面活性剤、安定化剤等を含む。緩衝剤としては通常のものが使用され、第1試液および第2試液のpHを通常5~10に調製するものが好ましい。

フェノール誘導体の含有量は第1試液において $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3}$ Mである。カッブラーの含有量は第2試液において $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-3}$ Mである。

本発明に用いる試薬には、他の酵素、基質、各種安定剤、如害物質除去のための試薬、界面活性剤等を含んでいてもよい。

次に基質又は酵素活性について具体的に説明する。本発明はこれらの具体的に説明されるものに限定されない。

基質として例えばコレステロールエステルを測定するには、第1試液として、コレステロールオ

キシダーゼ、ペルオキシダーゼとフェノール誘導体と緩衝剤を含む試液を調製し、第2試液としてコレステロールエステラーゼと4-アミノアンチビリンと緩衝剤を含む試液を調製する。試料に第1試液を作用させ、遊離コレステロールから生成した過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下、フェノール誘導体と反応(自己結合)させた後、第2試液を作用させ、コレステロールのみから生成した過酸化水素にペルオキシダーゼの存在下、フェノール誘導体と4-アミノアンチビリンを作用させて発色体を得、これを比色定量する。

基質として例えばトリグリセライドを測定するには、第1試液としてグリセロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼとフェノール誘導体と緩衝剤を含む試液、又はグリセロールキナーゼ、グリセロリン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼとフェノール誘導体と緩衝剤を含む試液を調製し、第2試液としてリボプロテインリバーゼと4-アミノアンチビリンと緩衝剤を含む試液を調製する。試料

用し得る。

本発明方法は第1試液と第2試液との混合液を用いる定量法に比べて、試料中に共存する測定誤差を生ずる物質の計り込みを減少させ、真の基質又は酵素活性を簡単に測定することが可能となつた。

次に本発明を実施例を用いて説明する。

実施例 1

サンプル中のトリグリセライドを下記試薬を用い、下記方法により測定した。

- 1 サンプル：グリセリン(2.6mg/dL)溶液 ①
- グリセリン(5.2mg/dL)溶液 ②
- グリセリン(10.4mg/dL)溶液 ③
- 血清a：水=9:1 ④
- 血清a：グリセリン水溶液 ⑤
- (1.040mg/dL)=9:1
- 血清b：水=9:1 ⑥
- 血清b：グリセリン水溶液 ⑦
- (1.040mg/dL)=9:1

に第1試液を作用させて、遊離グリセロールから生成した過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下、フェノール誘導体と反応(自己結合)させた後、第2試液を作用させ、トリグリセライドから生成したグリセロールのみから生成した過酸化水素を比色定量する。

酵素として、例えばダルタミン酸ビルピン酸トランスマニナーゼ(GPT)の活性を測定するには、第1試液としてビルピン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼとフェノール誘導体と緩衝剤を含む試液を調製し、第2試液として α -ケトグルタル酸、D,L-アニリンと4-アミノアンチビリンと緩衝剤を含む試液を調製し、試料に第1試液を作用させて遊離ビルピン酸から生成した過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下、フェノール誘導体と反応(自己結合)させた後、第2試液を作用させ、GPTの作用により生成したビルピン酸のみから生成した過酸化水素を比色定量する。

本発明方法は上記基質、酵素活性の測定のほかに、他の酸化酵素による過酸化水素の測定にも利

2 試薬：

フェノール誘導体が下記第1表に示される化合物である試薬A～eおよび試薬a～eを調製した。

第1試液 トリス緩衝液(pH7.0)

グリセロキナーゼ	2.0単位/mL
グリセロリン酸オキシダーゼ	6.0単位/mL
ペルオキシダーゼ	10.0単位/mL
フェノール誘導体	5mg/dL

第2試液 トリス緩衝液(pH7.0)

リボプロテインリバーゼ	600単位/mL
4-アミノアンチビリン	10mg/dL
N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-m-アニシジン	9.0mg/dL

第1表

	試薬	フェノール誘導体
本発明	A	3-アセチル-4-クロロフェノール
比較例	b	なし
	c	フェノール
	d	m-ブロムフェノール
	e	p-クロロフェノール
		2,4-ジクロロフェノール

3. 測定法

各サンプル 20 μ L に第1試液 2 μ L を加え、37℃にて5分間反応させた後、第2試液を1 μ L 加えて37℃にて10分間反応させ、4-アミノアンチビリンとN-エチル-N-(3-スルホプロピル)- α -アニシジンとの発色体を波長540 nmで測定した。その結果を第2表に示す。

第 2 表

サンプル 試薬	蒸留水	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
A	0.008	0.009	0.009	0.011	0.365	0.349	0.090	0.095
a	0.008	0.233	0.482	0.963	0.343	1.290	0.089	1.034
b	0.008	0.020	0.032	0.049	0.342	0.384	0.091	0.135
c	0.008	0.020	0.032	0.048	0.365	0.381	0.089	0.151
d	0.007	0.021	0.034	0.051	0.341	0.390	0.088	0.156
e	0.008	0.025	0.042	0.074	0.344	0.411	0.089	0.157

第2表において、蒸留水はサンプル①、②、③の対照例であり、サンプル④はサンプル⑤の対照例であり、サンプル⑥はサンプル⑦の対照例である。

試薬Aで用いた3-アセチル-4-クロロフェ

第1試液 トリス緩衝液 (pH 7.0)

グリセロキナーゼ	2.0単位/ μ L
グリセロリン酸オキシダーゼ	6.0単位/ μ L
ペルオキシダーゼ	10.0単位/ μ L
フェノール誘導体	5mg/dL

第2試液 トリス緩衝液 (pH 7.0)

リボプロテインリバーゼ	600単位/ μ L
4-アミノアンチビリン	10mg/dL
N,N-ジエチル- α -トルイジン	90mg/dL
トルイジン	

第 3 表

本発明	試薬	フェノール誘導体						
		A	B	a	b	c	d	e
	A	4-クロロ- α -クレゾール						
	B	4-ブロム- α -クレゾール						
比較例	a	4-レ						
	b	0-クロロフェノール						
	c	3,4-ジメトキシフェノール						
	d	0-イソプロピルフェノール						
	e	2,6-ジメトキシフェノール						

ノールは、他の試薬で用いた α -ブロムフェノール、 α -クロロフェノール、フェノール、2,4-ジクロロフェノールと比較してグリセロール消去能力において優れている。

実施例 2

サンプル中のトリグリセライドを下記試薬を用い、下記方法により測定した。

1. サンプル：グリセリン(2.6mg/dL)溶液	①
グリセリン(0.2mg/dL)溶液	②
グリセリン(1.04mg/dL)溶液	③
血清a：水 = 9 : 1	④
血清b：グリセリン水溶液	⑤
(1.04mg/dL) = 9 : 1	
血清b：水 = 9 : 1	⑥
血清b：グリセリン水溶液	⑦
(1.04mg/dL) = 9 : 1	

2. 試薬：

フェノール誘導体が下記第3表に示される化合物である試薬A～eおよび試薬a～eを調製した。

3. 測定法

各サンプル 20 μ L に第1試液 2 μ L を加え、37℃にて5分間反応させた後、第2試液を1 μ L 加えて37℃にて10分間反応させ、4-アミノアンチビリンとN,N-ジエチル- α -トルイジンとの発色体を波長540 nmで測定した。その結果を第4表に示す。

第 4 表

	蒸留水	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
A	0.008	0.010	0.012	0.015	0.372	0.377	0.122	0.127
B	0.008	0.009	0.010	0.011	0.375	0.377	0.125	0.123
a	0.008	0.260	0.518	1.066	0.371	1.411	0.120	1.150
b	0.008	0.023	0.053	0.050	0.370	0.423	0.124	0.167
c	0.008	0.018	0.028	0.040	0.372	0.404	0.125	0.156
d	0.007	0.017	0.029	0.051	0.373	0.418	0.122	0.157
e	0.008	0.025	0.082	0.158	0.375	0.528	0.125	0.277

試薬A、Bで用いた4-クロロ- α -クレゾール、4-ブロム- α -クレゾールは、他の試薬で用いた0-クロロフェノール、3,4-ジメトキシフェノール、0-イソプロピルフェノール、2,6-ジメトキシフェノール、

ジメトキシフェノールと比較してグリセロール消
去能力において優れている。

特開昭59- 11197(6)

特許出願人 東洋紡織株式会社